

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 0  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 0 ]

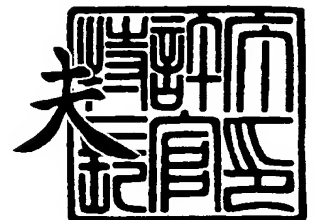
出 願 人 シスメックス株式会社  
Applicant(s):



2 0 0 4 年 3 月 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1131A

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/569

【発明者】

    【住所又は居所】 熊本県熊本市本荘 1 丁目 1 番 1 号 熊本大学医学部付属  
    病院内

    【氏名】 山口 一成

【発明者】

    【住所又は居所】 宮崎県宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 宮崎大学農学部付  
    属家畜病院内

    【氏名】 堀井 洋一郎

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス  
    株式会社内

    【氏名】 高浜 洋一

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス  
    株式会社内

    【氏名】 永井 慎也

【特許出願人】

    【識別番号】 390014960

    【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100088904

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 庄司 隆

    【電話番号】 03-3864-6572

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100124453

【弁理士】

【氏名又は名称】 資延 由利子

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗体測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 外来性抗原を起因とする疾患の検査を行う方法において、該外来性抗原が、該抗原に対して出現する免疫グロブリン抗体の I g M 抗体から I g G 抗体へのクラススイッチが I g M 抗体の出現から 2 ヶ月以上になされる性質を有する抗原であり、該外来性抗原に対する I g M 抗体を測定することを特徴とする抗体測定方法。

【請求項 2】 上記外来性抗原に対する抗体測定が、I g M 抗体単独、又は I g M 抗体及び I g G 抗体を同時に測定することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体測定方法。

【請求項 3】 上記外来性抗原が、神経性疾患に関連する微生物、ウイルス及び／又は蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗体測定方法。

【請求項 4】 上記外来性抗原が、ヒト及びヒトを除く哺乳動物のいずれかに対する疾患の起因となりうる微生物、ウイルス及び／又は蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の抗体測定方法。

【請求項 5】 上記外来性抗原が、ボルナ病ウイルス（BDV）である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 に記載の抗体測定方法。

【請求項 6】 ボルナ病ウイルス（BDV）を起因とする疾患の検査を行う方法において、該ウイルスに対する I g M 抗体単独、又は I g M 抗体及び I g G 抗体を同時に測定することを特徴とする抗体測定方法。

【請求項 7】 抗体測定方法が免疫凝集反応法である請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 に記載の抗体測定方法。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 に記載の抗体測定方法に使用する免疫測定用試薬又は該免疫測定用試薬を含む免疫測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、外来性抗原を起因とする疾患の検査を行う方法に関し、特に微量の外來性抗原を起因とする疾患に関連する抗体測定方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

免疫グロブリンは、I g G、I g A、I g M、I g D、I g Eなどの各クラスが存在する。抗原刺激に対応して、最初にI g M抗体が出現し、その半減期が短いために早く消失し、次第にI g Gに置きかわる。同種赤血球凝集素、リウマトイド因子、異好抗体、寒冷凝集素は主にこのI g Mに属する（臨床検査法提要、金原出版株式会社、第31版、1998年、p.820）。

#### 【0003】

感染症の場合には、感染初期の血清と回復期血清の特異抗体価をペアで測定することが診断上有用である（臨床検査法提要、金原出版株式会社、第31版、1998年、p.808）。例えば、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染の測定を目的として、I g Mの測定方法が報告されている（特許文献1）。

しかしながら、I g G及びI g Mを同時に測定する方法は開示されていない。

#### 【0004】

上述したように、免疫グロブリンのI g GからI g Mへのクラススイッチは、I g Mの出現から通常1ヶ月程度で行われることが一般的に知られている。しかしながら、抗原となりうる物質の性状は未知のものも多く、また免疫グロブリンのクラススイッチに要する時間、その他の性質についてもいまだ解明されていないことは多い。

#### 【0005】

例えば、ボルナ病ウイルス(Borna Disease Virus, 以下「BDV」という。)を原因ウイルスとする免疫関与神経症候群であるボルナ病についてはいまだ解明されていないことも多い。ボルナ病は、ドイツおよびその周辺諸国で、四季を通じて馬に発生するウイルス性脳脊髄縁である。脳性麻痺や情動傷害等の症状を呈し、急性経過をたどると致死性である。脳性麻痺や情動傷害等の症状を呈し、急性経過をたどると致死性である。ラットに実験的に感染させると、多動、常同行動、運動障害および失調症を特徴とする多相性症候群を発症する(0. Narayanら, Sc

ience, 220:1401-1403(1983))。

B D V は、自然宿主であるウマに対する病原性が知られており、1985年に精神疾患患者の血清中に B D V と反応する抗体が存在することが指摘され、ヒトに対しても病原性をもつ可能性が示唆されてきた。B D V の感染疫学的研究は、精神疾患の理解に多大な貢献をすることになる。最近、B D V 遺伝子が精神疾患遺伝子群の血球にある頻度で認められている。

#### 【 0 0 0 6 】

B D V は低い力価でしか増殖しないので、分析のために精製することは困難である。B D V の配列及び診断方法は既にいくつか報告されている（特許文献 2 ～ 4）。しかしながら、これらの測定方法は全て B D V に対する I g G 抗体を検出するための測定方法に関する。これらの測定方法が、ボルナ病の発症を十分に反映しうるか否かはいまだ十分ではなかった。

#### 【 0 0 0 7 】

##### 【特許文献 1】

特表平 1 0 - 5 0 2 2 5 3 号公報

##### 【特許文献 2】

特開 2 0 0 2 - 1 9 0 2 8 8 号公報

##### 【特許文献 3】

特表 2 0 0 2 - 5 0 0 3 6 3 号公報

##### 【特許文献 4】

特開平 1 1 - 1 8 0 9 9 8 号公報

#### 【 0 0 0 8 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、外来性抗原を起因とする疾患の検査をより正確に実施する方法を提供することにある。

#### 【 0 0 0 9 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、外来性抗原に対して出現する免疫グロブリンが、I g M から I g G にクラススイッチするのに要

する時間が2ヶ月以上、具体的には1年以上要するものがあることに着目し、本発明を完成した。

### 【0010】

すなわち本発明は、

1. 外来性抗原を起因とする疾患の検査を行う方法において、該外来性抗原が、該抗原に対して出現する免疫グロブリン抗体の I g M抗体から I g G抗体へのクラススイッチが I g M抗体の出現から2ヶ月以上になされる性質を有する抗原であり、該外来性抗原に対する I g M抗体を測定することを特徴とする抗体測定方法、
2. 上記外来性抗原に対する抗体測定が、I g M抗体単独、又は I g M抗体及び I g G抗体を同時に測定することを特徴とする前項1に記載の抗体測定方法、
3. 上記外来性抗原が、神経性疾患に関連する微生物、ウイルス及び／又は蛋白性物質であることを特徴とする前項1又は2に記載の抗体測定方法、
4. 上記外来性抗原が、ヒト及びヒトを除く哺乳動物のいずれかに対する疾患の起因となりうる微生物、ウイルス及び／又は蛋白性物質であることを特徴とする前項1～3のいずれか1に記載の抗体測定方法、
5. 上記外来性抗原が、ボルナ病ウイルス（BDV）である前項1～4のいずれか1に記載の抗体測定方法、
6. ボルナ病ウイルス（BDV）を起因とする疾患の検査を行う方法において、該ウイルスに対する I g M抗体単独、又は I g M抗体及び I g G抗体を同時に測定することを特徴とするの抗体測定方法。
7. 抗体測定方法が免疫凝集反応法である前項1～6のいずれか1に記載の抗体測定方法、
8. 前項1～7のいずれか1に記載の抗体測定方法に使用する免疫測定用試薬又は該免疫測定用試薬を含む免疫測定キット、からなる。

### 【0011】

#### 【発明の実施の形態】

外来性抗原であるウイルス等に感染するとまず I g Mが出現し、除々にその量が減少しながら次に I g G抗体が出現する。通常、I g Gが出現するのは感染後

2～4週間後なので、一般的にはウイルス等の感染の検査はIgGをターゲットとして行う。ところが、IgMからIgGへのクラススイッチに要する時間は、抗原の性質により異なることは従来ほとんど報告されていなかった。本発明者らは、ある種のウイルス、特に微量なウイルスについて検討した結果、IgMからIgGへのクラススイッチに1年以上要する知見を見出した。このような場合には、IgGのみを測定していたのでは、ウイルス感染の初期の段階を見逃すおそれが生じる。そこで本発明者らは、IgMが検出される感染初期の段階についても抗体測定を可能とし、外来性抗原を起因とする疾患の検査をより正確に実施する方法を検討した。

#### 【0012】

(外来性抗原)

本発明において、外来性抗原とは、自己の生体成分でない物質であって、生体外から侵入する抗原をいい、自己免疫疾患等のように自己の生体組織に起因して生じる内在性抗原と区別する。このような抗原の例としては、生体外から侵入してある種の疾患の起因となりうる物質であれば良く、特に限定されないが、例えば細菌、真菌等の微生物、ウイルス及び蛋白質等の抗原性物質が挙げられる。

#### 【0013】

本発明の抗体測定方法が適用される外来性抗原の具体例として、ある種のウイルスが挙げられる。たとえば、感染したウイルスの量が微量であって、ウイルスを生体から分離することが非常に困難な場合には、該ウイルス成分を直接測定することも困難であるため、該ウイルスに対する抗体が出現するのを測定すること以外には該ウイルスの感染を検査することが困難である。このようなウイルスの例として神経細胞に感染し、ウイルスそのものは神経細胞に埋没してしまうようなものが挙げられる。例えばヘルペスウイルス科、パポウイルス科、レトロウイルス科に属するウイルスや麻疹ウイルスなどが例示される。ヘルペスウイルス科に属するウイルスは、アルファヘルペスウイルス亜科、ベータヘルペスウイルス亜科、ガンマヘルペスウイルス亜科などに分類される。具体的には、次に示すウイルスが挙げられる。

#### 【0014】



## ヘルペスウイルス科 (Family Herpesviridae)

## アルファヘルペスウイルス亜科 (Subfamily Alphaherpesvirinae)

## シンプレックスウイルス属 (Genus Simplexvirus)

Bウイルス=サルヘルペスウイルス、

ウシ乳頭炎ウイルス=ウシヘルペスウイルス、

単純ヘルペスウイルス1,2=ヒトヘルペスウイルス1,2

## バリセロウイルス属 (Genus Varicellovirus)

オーエスキーウイルス=ブタヘルペスウイルス 1

ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRウイルス) =ウシヘルペスウイルス 1

ウマ流産ヘルペスウイルス=ウマヘルペスウイルス 1

帯状疱疹ウイルス=ヒトヘルペスウイルス 3

## その他

ネコウイルス性鼻気管炎ウイルス=ネコヘルペスウイルス 1

イヌ気管気管支炎ウイルス=イヌヘルペスウイルス

伝染性喉頭気管炎ウイルス=ニワトリヘルペスウイルス 1

アヒルペストウイルス=アヒルヘルペスウイルス 1

ウシ脳炎ヘルペスウイルス=ウシヘルペスウイルス 5

溝疹ウイルス=ウマヘルペスウイルス 3

## ベータヘルペスウイルス亜科 (Subfamily Betaherpesvirinae)

## サイトメガロウイルス属 (Genus Cytomegalovirus)

ヒトサイトメガロウイルス=ヒトヘルペスウイルス 5

## ロゼオロウイルス属 (Genus Roseolovirus)

ヒトヘルペスウイルス 6

## その他

ブタヘルペスウイルス 2

ウマヘルペスウイルス 2

ウマヘルペスウイルス 5

ウマヘルペスウイルス 7

## ガンマヘルペスウイルス亜科 (Subfamily Gammaherpesvirinae)

リンフォクリプトウイルス属 (Genus Lymphocryptovirus)

エプスタイン・バーウイルス=ヒトヘルペスウイルス 4

チンパンジーヘルペスウイルス

ヒビヘルペスウイルス

【0015】

パポバウイルス科 (Family Papovaviridae)

ポリオーマウイルス属 (Genus Polyomavirus)

サル腎細胞空胞化ウイルス

マウスポリオーマウイルス

ウシポリオーマウイルス

パピローマウイルス属 (Genus Papillomavirus)

ウシパピローマウイルス 1～6

イヌ口腔乳頭腫ウイルス

【0016】

レトロウイルス科 (Family Retroviridae)

Genus "Mammalian type C retroviruses"

哺乳類C型ウイルス群

ネコ白血病ウイルス

ブタC型ウイルス

Genus "BLV-HTLV retroviruses"

ウシ白血病ウイルス=BLV

ヒトTリンパ向性ウイルス 1=HTLV-1

ヒトTリンパ向性ウイルス 2=HTLV-2

サルTリンパ向性ウイルス

Genus Lentivirus

ウマ伝染性貧血ウイルス

ウシ免疫不全ウイルス

ネコ免疫不全ウイルス

ヤギ関節炎脳炎ウイルス

ヒト免疫不全ウイルス 1 =HIV-1

ヒト免疫不全ウイルス 2 =HIV-2

サル免疫不全ウイルス=SIV

#### 【0017】

また、本発明の測定方法は、ヒト及びヒトを除く哺乳動物のいずれかに対する疾患の起因となりうる外来性抗原に適用することができる。例えば、人畜に対して共通に感染しうる微生物、具体的には、ウマ、ウシ、ヒツジ、ネコ、サル、ネズミ、ダチョウなどが挙げられる。

#### 【0018】

さらには、本発明の測定方法は、I g MからI g Gへのクラススイッチに要する時間が長い性質を有する外来性抗原に対して、好適に適用することができる。クラススイッチに要する時間は特に限定されるものではないが、例えば2ヶ月以上、好ましくは3ヶ月以上、より好ましくは1年以上を要し、また10年以内、好ましくは7年以内、より好ましくは4年以内にクラススイッチがなされる抗原に対して好適に適用される。BDV感染に関して約1年以上の期間をかけてI g MからI g Gにクラススイッチした免疫グロブリンが出現したことを、本発明者らは確認した。このようにクラススイッチに長時間を要する抗原は、BDV以外には現在殆ど確認されていないが、このような性質を有する抗原が新たに確認された場合には、そのような物質に対しても本発明の測定方法を適用することができるのはいうまでもない。

#### 【0019】

(抗体測定用試料)

本発明の抗体測定用試料は、生体内の抗体が測定することができれば良く、特に限定されないが、全血、血漿、血清、骨髄、 Buffyコート、尿、体液、唾液、鼻汁、涙液、糞便由来物等が例示される。

#### 【0020】

(抗体測定方法)

本発明の抗体測定方法は、I g Mクラスの免疫グロブリンとI g Gクラスの免

疫グロブリンを同時に測定しうる方法であれば特に限定されず、適用することができる。この方法としては、例えば酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、凝集法、ウエスタンブロット法、化学発光免疫測定法、など常用されている方法のいずれも適用することができるが、特に好ましい測定方法として、免疫凝集法が挙げられる。

例えば、凝集法的一种であるカウンティングイムノアッセイ法(Counting Immunoassay法：以下「C I A 法」という。)による測定は、Sysmex Journal Vol.20 No.1, 77-86(1997)に記載の方法により行うことができる。

#### 【 0 0 2 1 】

抗原ペプチド感作用担体の例として、有機高分子粉末、無機物質粉末、微生物、血球及び細胞膜片などが挙げられる。有機高分子粉末としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどが例示でき、好ましくはラテックス微粒子が広く利用される。ラテックスとしては、例えばポリスチレン、ポリスチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリルニトリル-ブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレート等が挙げられる。

#### 【 0 0 2 2 】

用するラテックス粒子の素材および粒子径は、免疫グロブリンの抗原抗体反応によりラテックス粒子が凝集塊を形成しうるものであれば良く、特に限定されない。ラテックスの平均粒径は、測定対象物の検出濃度あるいは測定機器により  $0.05 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 、好ましくは  $0.3 \sim 0.85 \mu\text{m}$  のものが適宜選択される。無機物質粉末としては、シリカ、アルミナ、あるいは金、チタン、鉄、ニッケル等の金属片などが例示される。

#### 【 0 0 2 3 】

抗原ペプチド感作用担体、具体的に抗原(抗体)結合ラテックス粒子と試料に含まれる抗体(抗原)が反応すると、抗体の量に応じてラテックス粒子が凝集する。カウンティングイムノアッセイでは凝集した粒子ひとつひとつの大きさの違いを弁別してカウントして測定を行う。例えば、凝集していない単独のラテックス粒子のカウント数を M (Monomer)、2 個以上のラテックス粒子が凝集したもの

のカウント数を P (Polymer)、M と P の和を T (Total) としたとき、 $P/T$  を凝集度として算出することができる。

#### 【0024】

担体への抗原感作は、抗原を直接ラテックス粒子に感作させても良く、例えば血清アルブミン等のようなりガンドを目的抗原に結合させて、ラテックス粒子に感作させるなど効率の良い方法を選択することができる。抗原感作量は、担体 1 mg あたり 100  $\mu$  g までの範囲で必要に応じて自由に設定することができる。好ましくは、上記抗原ペプチドおよび／またはコンジュゲート BDV 抗原ペプチドと非特異反応抑制のためのブロッキング剤として使用する蛋白質とあわせて合計 100  $\mu$  g までの範囲で設定することができる。ブロッキング剤は、抗原を感作した後または抗原と同時に担体に固定することができる。

#### 【0025】

CIA 法をはじめとする凝集法によると、ラテックス粒子に固定した抗原に対し、検体試料中の抗体が反応することにより、ラテックス粒子とラテックス粒子が抗体により架橋され、凝集を形成することになる。この場合に、IgM クラスの抗体であっても、IgG クラスの抗体であっても、ラテックスと反応すれば架橋を形成するので、IgM および IgG が混入している検体試料において、IgM および IgG を同時に測定することが可能となるのである。

#### 【0026】

測定方法は、公知の方法に従い、用いられる不溶性担体の大きさもしくは濃度、反応時間を設定することにより、散乱光強度、吸光度または透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行うことができ、これらの方法を 2 種以上併用してもよい。

#### 【0027】

本発明は、上記免疫測定方法に使用する免疫測定用試薬キットにも及ぶ。

#### 【0028】

#### 【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

## 【 0 0 2 9 】

(実施例 1) B D V の検出

本実施例は、宮崎県都井岬で管理されているウマ 1 7 頭について、B D V の感染の有無を調べた。測定は、1998 年に採取した血清について行った。

## 【 0 0 3 0 】

(ウマ血しょうの処理方法)

ヘパリン採血による採血後、氷冷し、当日中に処理し、血しょうサンプルを得た。

## 【 0 0 3 1 】

(抗原ペプチド)

p 2 4 (A)	GG-QPVDQLLKDLRKNS	(配列番号 1)
p 4 0 (C)	GG-PKRRLVDDADAMEDQDLY	(配列番号 2)
p 4 0 (D)	GG-RYRRREISRGEDGAELSGE	(配列番号 3)
p 1 0 (G)	G-GNATIESGRLPGGRRRSPD	(配列番号 4)
p 1 0 (H)	G-GVTKTTEDPKECTDP	(配列番号 5)

## 【 0 0 3 2 】

(抗原ペプチドの感作)

- 1) 抗原ペプチド p 2 4 (A) : ペプチド 300  $\mu$  g をウシ血清アルブミン (B S A) 120  $\mu$  g とコンジュゲートさせたもの、
  - 2) 抗原ペプチド p 4 0 (C) : ペプチド 300  $\mu$  g を B S A 120  $\mu$  g とコンジュゲートさせたもの、
  - 3) 抗原ペプチド p 4 0 (D) : ペプチド 300  $\mu$  g を B S A 120  $\mu$  g とコンジュゲートさせたもの、
  - 4) 抗原ペプチド p 1 0 (G) : ペプチド 300  $\mu$  g を B S A 120  $\mu$  g とコンジュゲートさせたもの、
  - 5) 抗原ペプチド p 1 0 (H) : ペプチド 300  $\mu$  g を B S A 120  $\mu$  g とコンジュゲートさせたもの、
- 上記 1) ~ 5) の B D V 抗原コンジュゲートを、粒径 0. 8  $\mu$  m のラテックス粒子懸濁液 (5 m g のラテックス担体を含む) 1 m l に加え、3 7  $^{\circ}$  C で 1 時間静置

した。その後、ラテックス粒子を洗浄し、各抗原の感作ラテックス液を調製した。また同様にウシ血清アルブミン (BSA)  $120 \mu\text{g}$  を粒径  $0.8 \mu\text{m}$  のラテックス粒子懸濁液 ( $5 \text{mg}$  のラテックス担体を含む)  $1 \text{ml}$  に加え、 $37^\circ\text{C}$  で1時間静置した。その後、ラテックス粒子を洗浄し、未感作ラテックス液を調製した。

### 【0033】

(測定)

BDV抗体の測定をシスメックス社製測定装置 (PAMIA-50) を用いて行った。

反応プレートのウェルに、ラテックス凝集反応用緩衝液を  $80 \mu\text{l}$ 、各ウマ血清試料を  $10 \mu\text{l}$  および上記調製したラテックス粒子を含む溶液を  $10 \mu\text{l}$  を添加し、 $45^\circ\text{C}$  で反応させた。

反応を開始して約15分後に  $19 \mu\text{l}$  の反応混合物を装置のチャンバ内の  $950 \mu\text{l}$  のシース液に加えて51倍に希釈した。希釈により、凝集反応を停止させ、その後、凝集度を光学検出部で検出した。

予め測定しておいた検量線 (陰性コントロール P/T% およびカットオフコントロール P/T%) より式1に従い、検体のカットオフインデックス (COI) 値を求めた。検体の COI 値により、以下のとおり判定した。

陽性:  $\text{COI} \geq 1$

陰性:  $\text{COI} < 1$

### 【0034】

【式1】

$$\text{カットオフインデックス (COI)} = \frac{\left( \text{検体測定値 P/T\%} - \text{未感作ラテックス粒子を用いたときの P/T\%} \right)}{\left( \text{カットオフコントロール P/T\%} - \text{陰性コントロール P/T\%} \right)}$$

### 【0035】

(測定結果)

上記の測定結果を表1に示した。その結果、全てのウマ血清についてBDV陽

性を示した。

### 【0036】

(比較例1)

実施例1に記載のウマ17頭について、従来法により1998年～2001年にかけて採取した血清について測定を行った。ウマ血清の処理方法は実施例1と同様に行った。

### 【0037】

1. 測定原理:

ECLIA法は、BDV抗原を結合したマイクロビーズを固相とし、電気化学変化で発光するRu錯体を標識した抗ヒトIgGモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法を原理としている。

各反応について以下に説明する。

・第一反応

抗原結合ビーズと検体を反応させると、検体中の抗体がビーズ上の抗原と結合する。

・第二反応

ビーズに結合した抗体にルチニウム標識抗ヒトIgGモノクローナル抗体を反応させ、サンドイッチ状に結合する。

・第三反応

電極上にビーズを集めて電気エネルギーを加えると、抗体を介してビーズに結合したルチニウム標識抗IgGモノクローナル抗体量に応じてRu錯体が発光する。この発光量を計測することにより、検体中の抗体を検出する。

### 【0038】

2. 測定方法:

以下の手順で測定を実施した。

(1) 反応管に反応液200 $\mu$ l、被検検体20 $\mu$ l、抗原結合ビーズ液を25 $\mu$ l注入し、30℃で9分間の反応を行った。(第一反応)

(2) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を吸引除去し、さらに洗浄液を注入し、振盪攪拌した。



(3) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を除去した。

(4) 反応管にルチニウム標識抗 IgG モノクロナール抗体液を  $200\ \mu\text{l}$  注入し、 $30^{\circ}\text{C}$  で 9 分間の反応を行った。(第二反応)

(5) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を除去し、さらに洗浄液を注入し、振盪攪拌した。

(6) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を除去し、発光電解液  $300\ \mu\text{l}$  注入し、ビーズをフローセル電極に導き、発光量を測定した。(第三反応)

#### 【0039】

(結果)

その結果、検体 No. 1～9 については、1998 年の結果を比較すると従来法では陰性であったが、本発明の測定方法では陽性であった(表 1)。しかし、従来法で 1998 年の測定結果が陰性と認められたものであっても 1999～2001 年の測定結果については、陽性が認められた。

一方、検体 No. 10～17 については従来法と本発明の測定結果ともに陽性であり、一致した(表 2)。また、検体 No. 18～28 については従来法と本発明の測定結果ともに陰性であり、一致した(表 3)。

不一致の検体については、従来法で陰性であったにもかかわらず、本発明の抗原ペプチドを用いて測定を行った系では陽性と判断され、感度よく BDV 抗体の検出が可能となった。なお、表 1～3 中の「ND」は、ウマを捕獲することができず、測定できなかったことを示す。

#### 【0040】

【表 1】

検体番号	本発明の方法単位:C. O. I.)					従来法 陽性:1000以上			
	1998年					1998年	1999年	2000年	2001年
	p24(A)	p40(C)	p40(D)	p10(G)	p10(H)				
1	2.5 (+)	1.58 (+)	0.00	0.76	4.38 (+)	228	349	1162 (+)	1334 (+)
2	1.3 (+)	1.02 (+)	0.26	1.4 (+)	4.14 (+)	588	763	2098 (+)	ND
3	24.62 (+)	12.66 (+)	1.62 (+)	10.1 (+)	6.78 (+)	634	511	1353 (+)	ND
4	60.44 (+)	29.7 (+)	1.74 (+)	9.81 (+)	4.78 (+)	361	1574 (+)	594	877
5	5.12 (+)	4.7 (+)	2.36 (+)	7.12 (+)	6.18 (+)	397	1115 (+)	1716 (+)	771
6	2.88 (+)	1.14 (+)	0.02	1.140 (+)	0.36	276	938	1580 (+)	1809 (+)
7	1.46 (+)	3.24 (+)	0.64	1.02 (+)	0.60	276	284	4834 (+)	9288 (+)
8	11.56 (+)	6.48 (+)	0.56	5.33 (+)	2.84 (+)	116	979	1630 (+)	791
9	89.46 (+)	54.76 (+)	13.84 (+)	76.42 (+)	54.64 (+)	31	ND	ND	22504 (+)

【0041】

【表 2】

検体番号	本発明の方法単位:C. O. I.)					従来法 陽性:1000以上			
	1998年					1998年	1999年	2000年	2001年
	p24(A)	p40(C)	p40(D)	p10(G)	p10(H)				
10	0.64	3.4 (+)	3.44 (+)	9.11 (+)	73.92 (+)	9124 (+)	9169 (+)	19569 (+)	13441 (+)
11	14.66 (+)	14.38 (+)	8.92 (+)	13.30 (+)	12.06 (+)	19648 (+)	10323 (+)	12544 (+)	13351 (+)
12	4.02 (+)	1.64 (+)	2.44 (+)	4.89 (+)	4.08 (+)	14710 (+)	ND	7462 (+)	ND
13	1.46 (+)	2.8 (+)	1.66 (+)	0.46	0.00	9614 (+)	10317 (+)	14289 (+)	12097 (+)
14	12.14 (+)	2.56 (+)	0.28	1.30 (+)	3.64 (+)	5960 (+)	3136 (+)	8933 (+)	ND
15	1.86 (+)	1.62 (+)	0.40	1.64 (+)	7.02 (+)	2689 (+)	ND	3625 (+)	1954 (+)
16	1.1 (+)	1.38 (+)	0.58	1.50 (+)	1.58 (+)	1365 (+)	ND	788	2051
17	9.36 (+)	6.7 (+)	0.00	2.16 (+)	0.10	1935 (+)	1269 (+)	ND	ND

【0042】

【表 3】

検体番号	本発明の方法(単位:C. O. I.)					従来法 陽性:1000以上			
	1998年					1998年	1999年	2000年	2001年
	$\mu\text{A}$	$\mu\text{C}$	$\mu\text{OD}$	$\mu\text{G}$	$\mu\text{H}$				
18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	407	851	869	944
19	0.56	0.22	0.16	0.00	0.00	103	308	310	245
20	0.58	0.34	0.20	0.64	0.14	165	820	3646 (+)	3206 (+)
21	0.12	0.24	0.00	0.00	0.00	449	292	644	823
22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	373	876	1398 (+)	2530 (+)
23	0.04	0.06	0.00	0.12	0.00	76	16429 (+)	391	390
24	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	443	566	1606 (+)	982
25	0.02	0.00	0.52	0.00	0.00	138	648	348	305
26	0.00	0.72	0.32	0.00	0.00	276	378	955	1851 (+)
27	0.62	0.80	0.08	0.28	0.00	263	805	751	ND
28	0.54	0.00	0.00	0.12	0.00	352	ND	ND	ND

## 【0043】

## (実験例 1)

従来法および本発明の方法による測定結果が不一致であった検体 No. 5 および 6 と測定結果が一致した検体 No. 11 および 12 について、検出された抗体のうちの IgM および IgG の割合を求めた。

吸収用試薬として、抗ウマ IgM ヤギ血清 (コスモバイオ) および抗ウマ IgG ヤギ血清 (コスモバイオ) 原液を使用した。緩衝液および抗ウマ IgM 血清を 9 : 1 で混合したものを IgM 吸収緩衝液とし、同様に。緩衝液および抗ウマ IgG 血清を 9 : 1 で混合したものを IgG 吸収緩衝液とした。

IgM 吸収緩衝液および IgG 吸収緩衝液について PAMIA-50 にて実施例 1 と同様の手法により P/T% の測定を行った。式 2 により、IgM 吸収率および IgG 吸収率を求めた。

## 【0044】

## 【式 2】

$$\text{IgM吸収率} = \frac{(\text{検体のCOI}) - (\text{IgM吸収緩衝液でのCOI})}{\text{検体のCOI}} \times 100(\%)$$

$$\text{IgG吸収率} = \frac{(\text{検体のCOI}) - (\text{IgG吸収緩衝液でのCOI})}{\text{検体のCOI}} \times 100(\%)$$

## 【0 0 4 5】

検体N o. 5 の1998年、1999年及び2001年に採取した血清の測定結果を各々図1～3に、検体N o. 6 の1998年～2001年の各年に採取した血清の測定結果を各々図4～7に、および検体N o. 11 の1998年に採取した血清の測定結果を各々図8に、検体N o. 12 の1998年に採取した血清の測定結果を図9に示した。

その結果、従来法および本発明の測定方法の測定結果に差を認めた検体N o. 5 およびN o. 6 については、1998年度および1999年度に採取した血清試料ではI g G の出現よりはI g M の出現が多く認められたのに対し、2001年度に採取した血清試料では、I g G の出現が認められた。一方、従来法および本発明の測定方法の測定結果に差を認めなかった検体N o. 11 およびN o. 12 については、1998年に採取した血清試料について、I g G のほうがI g M に比べて高く出現していた。

## 【0 0 4 6】

## (実施例 2)

宮崎県都井岬で管理されている82頭のウマについて、1998年に採取した血清について、凝集法（本発明の方法）および従来法で測定した結果、各測定法によりBDV抗体陽性および陰性と判断された群について5年間の生存率を調べた。その結果、表2に示すように、本発明の方法で測定した場合には抗体陽性の場合の死亡率が66.7%であり、抗体陰性の場合には死亡率が28.3%であった。一方、従来法による場合には抗体が陽性の場合の死亡率は52.4%であったが、抗体が陰性の場合でも死亡率は42.6%であった。この結果より、本発明の方法で測定したほうが抗体陽性の死亡率が高くあらわれ、測定結果が死亡率に反映しより正確な

B D V 感染の検査を行うことが可能となったことが確認された。

【0047】

【表 4】

BDV抗体陽性ウマの経過観察						
	1998	1999	2000	2001	2002	
凝集法(本発明方法)	36	陽性			生存確認	死亡+不明=24(66.7%)
					12(33.3%)	
					死亡確認	
					7(19.4%)	
					不明	
					17(47.2)	
凝集法(本発明方法)	46	陰性			生存確認	死亡+不明=13(28.3%)
					33(71.7%)	
					死亡確認	
					4(8.7%)	
					不明	
					9(19.6%)	
従来法	21	陽性			生存確認	死亡+不明=11(52.4%)
					10(47.6%)	
					死亡確認	
					5(23.8%)	
					不明	
					6(28.6%)	
従来法	61	陰性			生存確認	死亡+不明=26(42.6%)
					35(57.4%)	
					死亡確認	
					6(9.8%)	
					不明	
					20(32.8%)	

【0048】

#### 【発明の効果】

以上説明したように本発明の測定方法により、B D V についての I g M 及び I g G を同時に測定した結果、従来法で測定した際に検出できなかった試料についても B D V 陽性と判定することができた。本発明により、免疫グロブリンの I g M から I g G へのクラススイッチに要する時間の長い外来性抗原であって、抗原

量が微量等のために抗原そのものを検出することができないような場合であっても、I g M抗体の出現を見逃すことなく検出することにより、感染の有無を判定することが可能となり有用である。

【 0 0 4 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sysmex Corporation

<120> A detection method for IgM and IgG

<130> NP02-1131

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 1

Gln Pro Val Asp Gln Leu Leu Lys Asp Leu Arg Lys Asn Pro Ser

1                      5                      10                      15

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 2

Pro Lys Arg Arg Leu Val Asp Asp Ala Asp Ala Met Glu Asp Gln Asp

1 5 10 15

Leu Tyr

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 3

Arg Tyr Arg Arg Arg Glu Ile Ser Arg Gly Glu Asp Gly Ala Glu Leu

1 5 10 15

Ser Gly Glu

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 4

Gly Asn Ala Thr Ile Glu Ser Gly Arg Leu Pro Gly Gly Arg Arg Arg

1 5 10 15

Ser Pro Asp

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 5

Gly Val Thr Lys Thr Thr Glu Asp Pro Lys Glu Cys Thr Asp Pro

1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図 1】

検体No. 5の1998年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 2】



検体No. 5の1999年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 3】

検体No. 5の2001年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 4】

検体No. 6の1998年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 5】

検体No. 6の1999年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 6】

検体No. 6の2000年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 7】

検体No. 6の2001年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 8】

検体No. 11の1998年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

【図 9】

検体No. 12の1998年採取試料の測定結果を示す図である（実験例 1）。

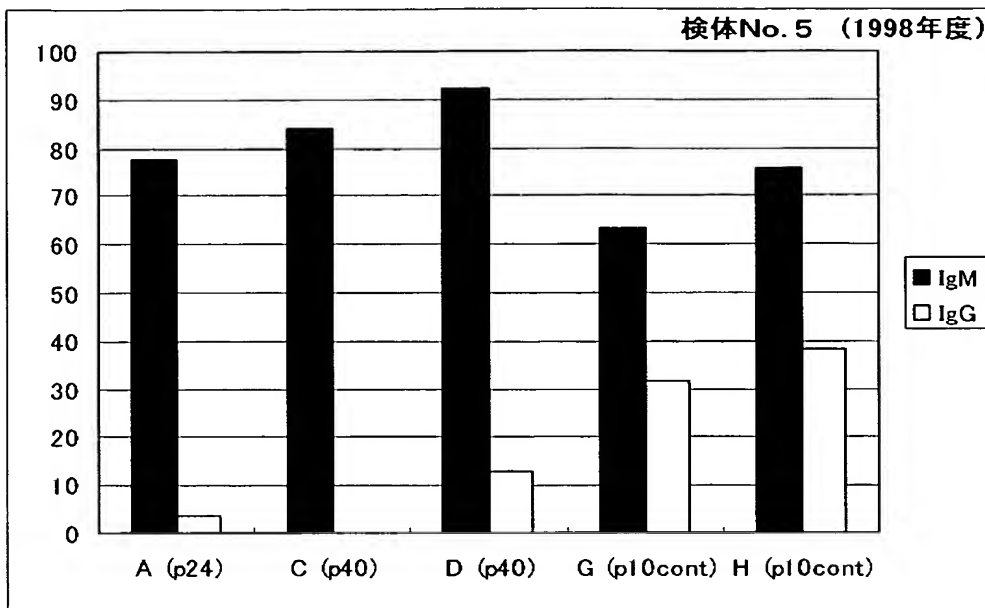
【符号の説明】

■ I g M

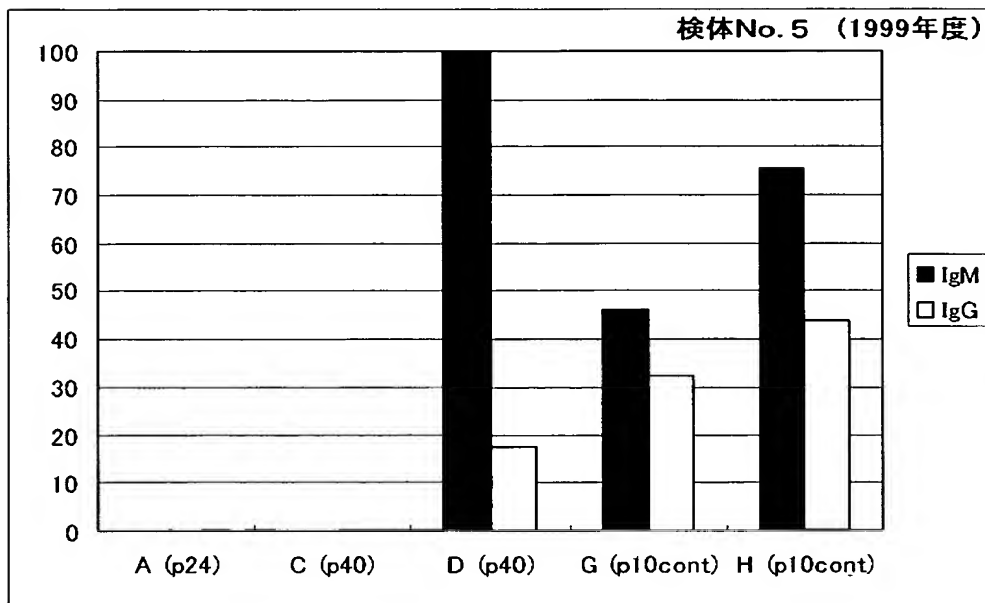
□ I g G

【書類名】 図面

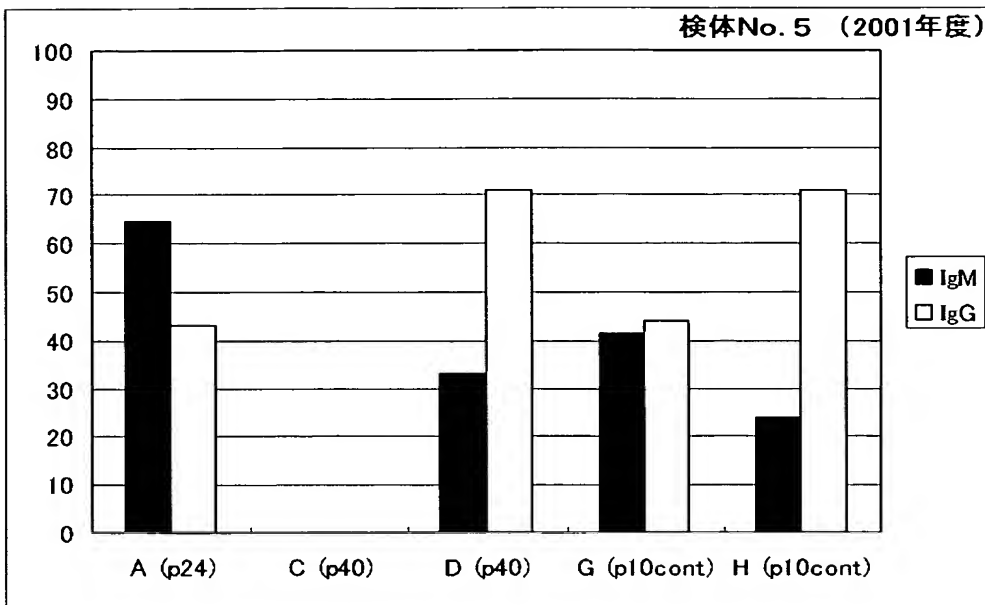
【図 1】



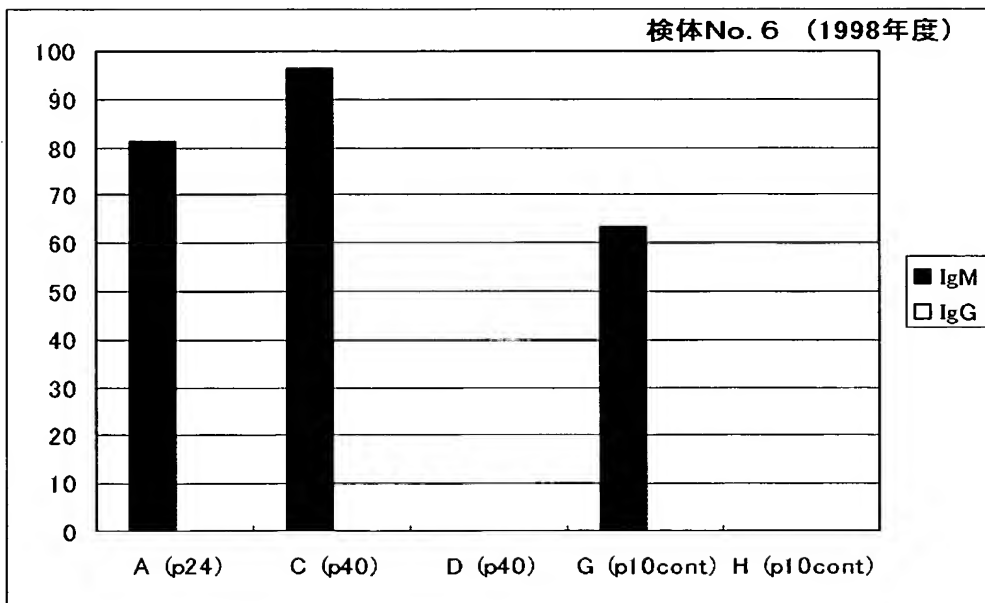
【図 2】



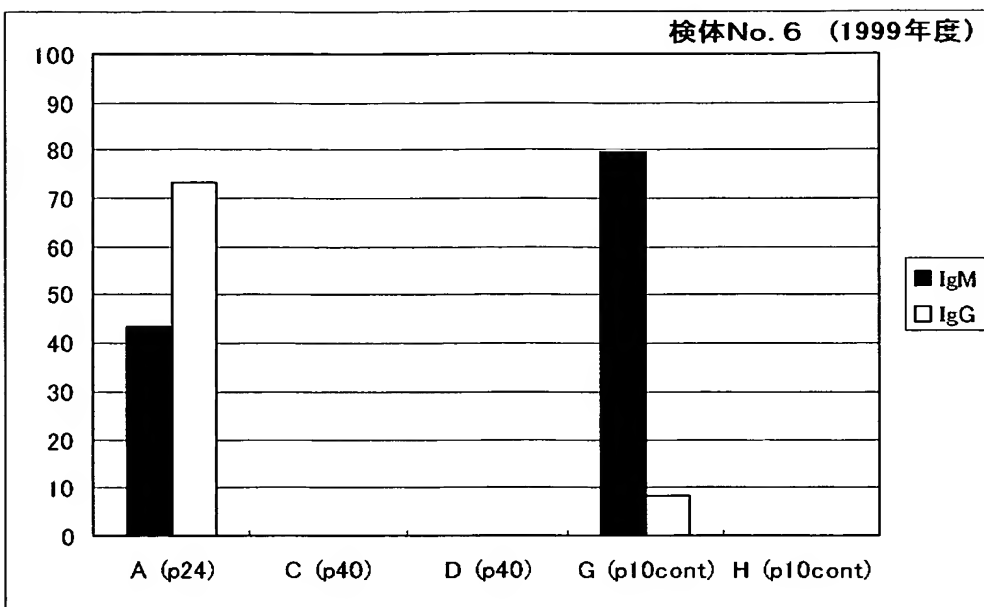
【図 3】



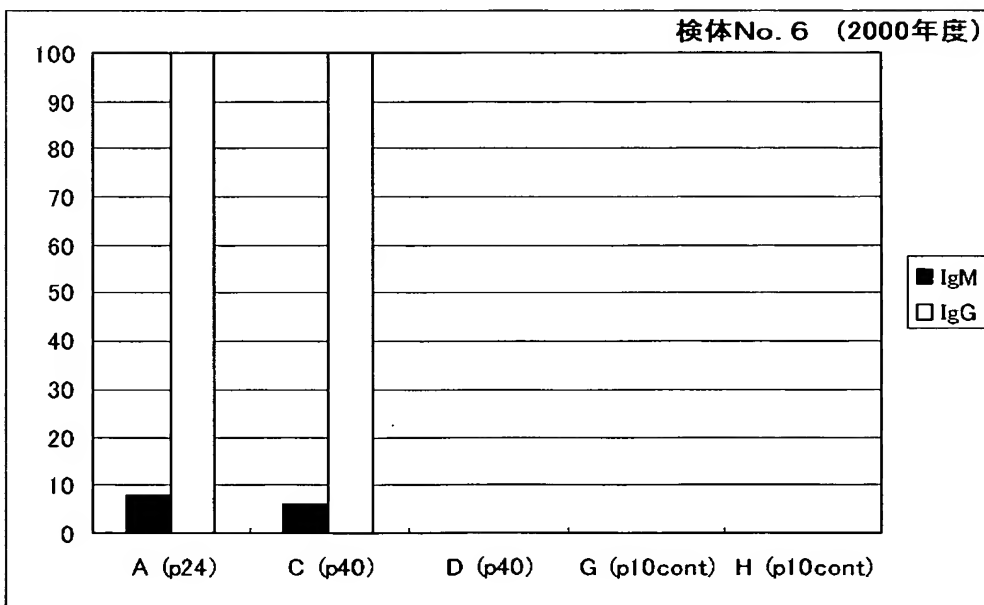
【図 4】



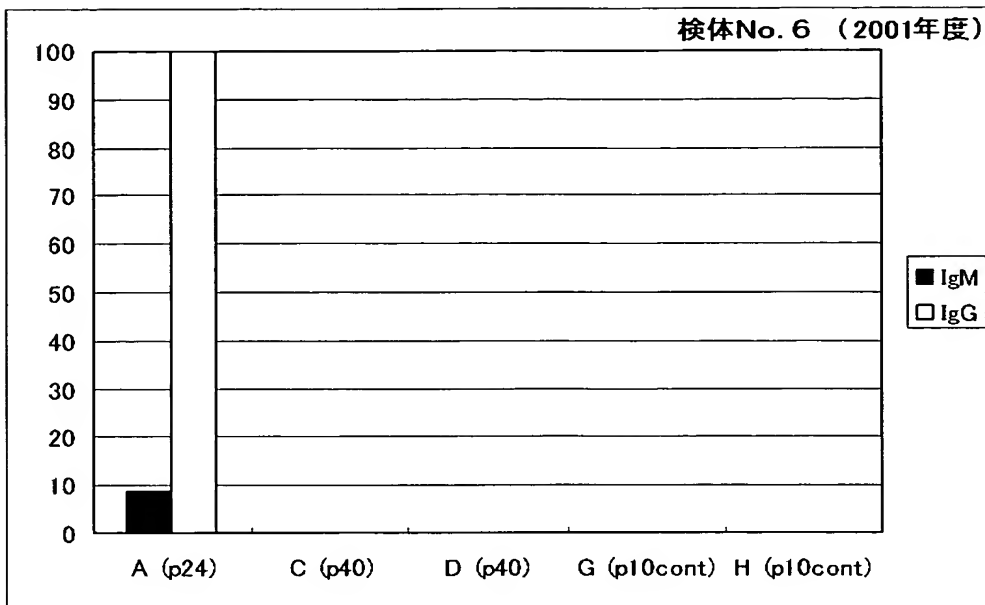
【図 5】



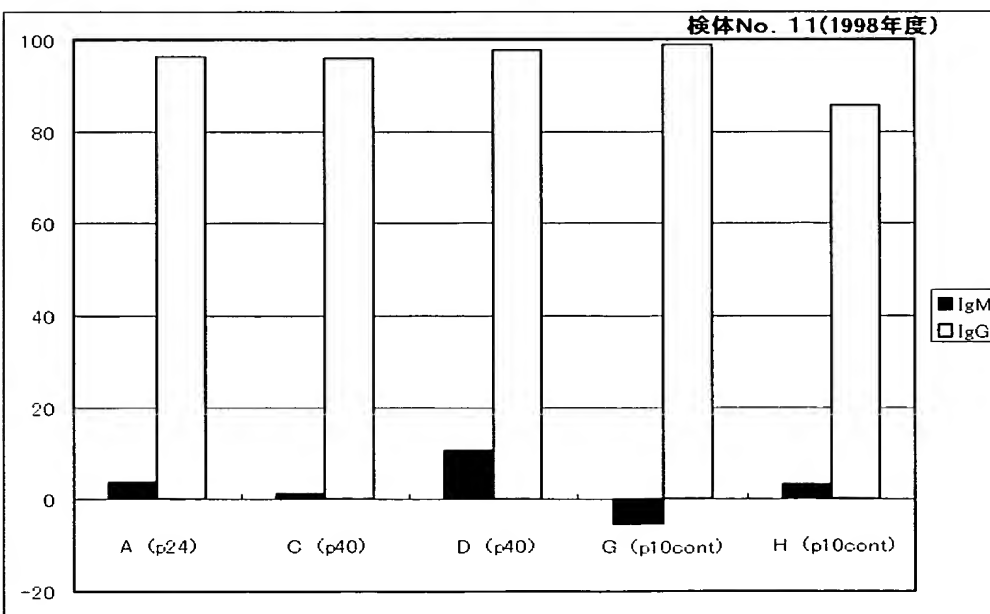
【図 6】



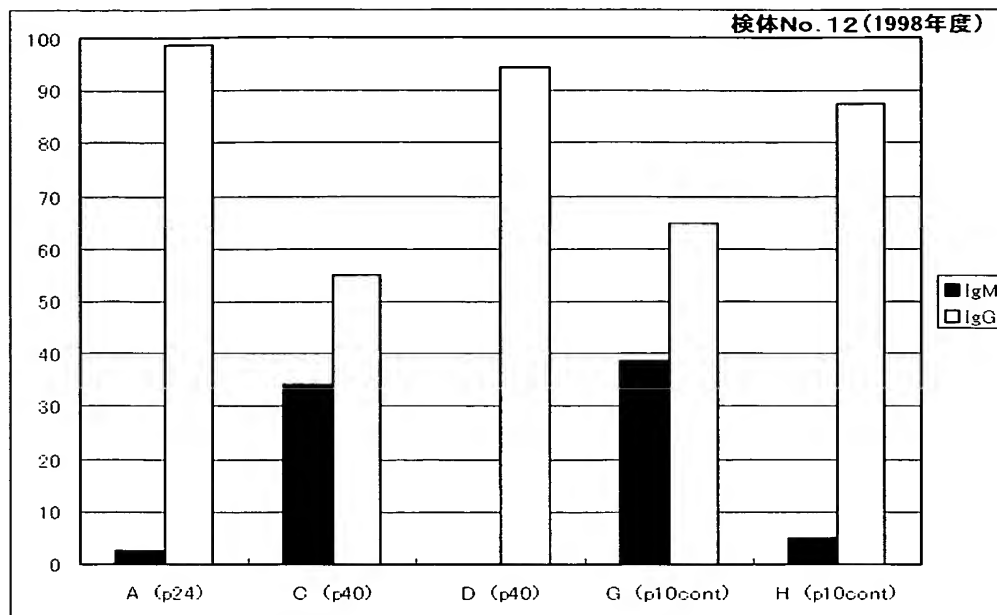
【図 7】



【図 8】



【図 9】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 外来性抗原を起因とする疾患の検査をより正確に実施する方法を提供する。

【解決手段】 外来性抗原に対して出現する免疫グロブリンについて、I g M から I g G にクラススイッチするのに要する時間が 1 年以上要する場合に、該外来性抗原に対する I g M 抗体および I g G 抗体を同時に測定することにより達成される。このような測定方法を適用しうる疾患の起因となる外来性抗原の例として、神経性疾患に関連する微生物、ウイルス及び／又は蛋白性物質やヒト及びヒトを除く哺乳動物のいずれかに対する疾患の起因となりうる微生物、ウイルス及び／又は蛋白性物質等が挙げられる。具体的にはボルナ病ウイルス（B D V）に抗体測定に本発明の測定方法を適用することができる。



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 0
受付番号	5 0 3 0 0 . 4 9 6 5 7 8
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 3 月 2 7 日

### < 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 3月26日

次頁無





特願 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 9 0 0 1 4 9 6 0 ]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 1 0 月 7 日

[変更理由] 名称変更

住所変更

住 所 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号  
氏 名 シスメックス株式会社